

Zur Hippursäureausscheidung nach Medikamenteneinnahme

von

Ulf Glawatz

aus

Buxtehude



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548611_0018

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Zur Hippursäureausscheidung nach Medikamenteneinnahme

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Ulf Glawatz
aus
Buxtehude

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg

Zur Hippursäureausscheidung nach Medikamenteneinnahme

INSTITUT FÜR
PHYSIOLOGIE UND
DIÄETETIK
DER UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG



Dekan: Prof. Dr. W. Schiefer
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 7.3.1972

Meiner Mutter

	Seite
A) <u>Einleitung und Problemstellung</u>	6
1. Medikation und Hippursäure-, bzw. Benzoessäureausscheidung	6
2. Ergebnisse von Harnuntersuchungen nach Walz	6
3. Benzoessäure als Zerfallsprodukt von Hippursäure bei der Harnanalyse	7
4. Abwesenheit von Benzoessäure in frischen Harnproben	7
5. Problemstellung	8
B) <u>Theoretische Vorbemerkungen über die Hippursäure</u>	8
1. Die Komponenten	8
a) Benzoessäure	9
b) Glykokoll	9
2. Entgiftung der Benzoessäure	10
3. Tägliche Ausscheidung von Hippursäure	10
4. Faktoren, welche die Hippursäuremengen im Urin beeinflussen	11
a) Exogene Faktoren	11
a1 Nahrungsmittel	11
a2 Pharmaka	12
b) Endogene Bildung der Hippursäure	13
b1 Karenzversuch	13
b2 Diätkost	13

C) <u>Frühere vorbereitende Untersuchungen</u>	15
1. Allgemeines	16
2. Verwendetes Material	16
3. Versuchspersonen	16
4. Zeitlicher Ablauf der Versuche	17
5. Experimentelles Vorgehen	19
a) Einnahme des Barbiturates	19
b) Aufarbeitung der Urinausscheidung	19
6. Gefundene Metaboliten nach Verabreichung von:	20
a) Speda ^R	20
b) Isoamyl-Speda	22
D) <u>Eigene Versuche</u>	22
1. Ziel der Untersuchungen	22
2. Übernommenes Material	23
3. Experimentelles Vorgehen	23
a) Herstellung der Hippursäure-Eichkurve	23
b) Aufarbeiten der Urinproben	24
c) Chromatographische Trennung der Metaboliten	24
d) Kontrolluntersuchungen	25
e) Untersuchung der Fraktion mit dem Rf-Wert 0,35 - 0,46	26
e1 Isolierung einer kristallinen Substanz	26
e2 Vakuumsublimation	26
e3 Versuche zur Gewinnung von reinem Monobarbiturat	27

	Seite
4. Auswertung	28
E) <u>UV-spektrophotometrische Auswertung der</u> <u>Hippursäurefraktionen von drei Barbiturat-</u> <u>versuchen (Speda^R)</u>	29
1. Ermittlung der Hippursäurekonzentration und Hippursäuremenge einzelner Harnproben	29
2. Darstellung der Hippursäureausscheidung unter verschiedenen Gesichtspunkten	30
a) Hippursäuremengen einzelner Urin- proben in zeitlichem Ablauf	30
b) Tagesausscheidung	36
3. Vermutliche Ursache der stark schwankenden Werte	39
F) <u>Diskussion und Zusammenfassung</u>	40
G) <u>Literatur</u>	41

A) Einleitung und Problemstellung

1. Medikation und Hippursäure-, bzw. Benzoessäureausscheidung

Hippursäure und Benzoessäure gehören nach der älteren Literatur (siehe Kadelburg 1971) zu den Substanzen, die normalerweise in wechselnden Mengen im menschlichen Urin vorkommen. Insbesondere nach Einnahme verschiedener Medikamente wurde öfters eine der beiden Substanzen oder Derivate derselben im Urin nachgewiesen. Dies gilt sicher für Medikamente oder Verbindungen, die Benzoessäure oder Verbindungen hiervon enthalten, oder aus denen diese im Stoffwechsel freigesetzt werden.

2. Ergebnisse von Harnuntersuchungen nach Walz

Bei Harnuntersuchungen nach therapeutischer Adalineinnahme stellte Walz (1954) eine deutliche Vermehrung der Benzoessäure im Urin des nächsten Tages fest, die besonders auffallend nach erstmaliger Medikation bzw. Verabreichung nach Pausen von mehreren Wochen ausfiel. Hippursäure trat in stark wechselnden Mengen auf. Entsprechende Ergebnisse brachten Versuche mit Persedon, Cliradon, Barbituraten und verschiedenen Pyrazolonderivaten (Schmidt 1956).

3. Benzoessäure als Zerfallsprodukt von Hippursäure bei der Harnanalyse

Das Auftreten von Benzoessäure führt Deisel (1955) aber für seinen sehr ähnlichen Versuch auf teilweisen Zerfall der Hippursäure durch Vakuumsublimation bei Temperaturen über 200° C zurück, die zur Analyse der Harnextrakte angewandt wurden, da er bei niedrigeren Temperaturen keine Benzoessäure fand. Dieser Befund kann als Hinweis angesehen werden, daß möglicherweise allein die Hippursäure als Folge einer Medikamenteinnahme vermehrt auftritt.

4. Abwesenheit von Benzoessäure in frischen Harnproben

Ziener (1971) konnte bei Harnanalysen in frischen Harnproben nur Hippursäure nachweisen, während Benzoessäure in Harnproben gefunden wurde, die längere Zeit gelagert worden waren. Die Umsetzung von Hippursäure zu Benzoesäure und Glykokoll konnte dabei durch ein sehr stabiles Ferment, die Hippuricase erfolgen, die wochenlang haltbar ist und in Bakterien und Schimmelpilzen vorkommt. Sie befindet sich im Körper physiologisch zur Synthese von Hippursäure in Leber und Niere. Bei einem pH-Wert von über 5,4 spaltet die Hippuricase jedoch Hippursäure.

5. Problemstellung

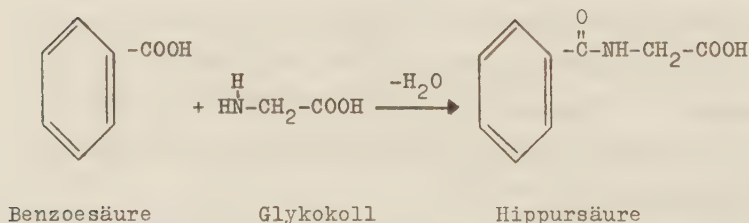
Aufgabe meiner Arbeit war es, die Hippursäureausscheidung über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Einnahme des Barbiturates Speda^R (Vinylbital) quantitativ zu bestimmen. Daneben sollte der Versuch unternommen werden, das nach Einnahme von Speda^R und einem dem Speda^R sehr verwandten Barbiturat, der 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure, als Metabolit auftretende Monobarbiturat aus Harnproben zu isolieren.

B) Theoretische Vorbemerkungen über die Hippursäure

(siehe Kadelburg 1971)

1. Die Komponenten

Die Komponenten der Hippursäure sind Benzoesäure und Glykokoll.



a) Benzoessäure

Die Benzoessäure, eine einfache aromatische Verbindung, gelangt hauptsächlich in der Form der nicht aromatisierten Vorstufe als Chinasäure durch vegetabilische Bestandteile der Nahrung in den Organismus oder wird als Benzoesäure oder Parahydroxybenzoessäure, die wegen ihrer bakteriostatischen Wirkung weit verbreitete Konservierungsmittel sind, aufgenommen (Derache und Gourdon 1963, van Sumere und Mitarb. 1969, Möller 1961). Dazu fallen noch kleinere Mengen aus dem Eiweißstoffwechsel (Vollgraff 1967, Lang 1960, Bernhard und Mitarb. 1955) aus Fäulnisvorgängen im Darm (Struwe 1953) und fermentativen Prozessen an (Vollgraff 1967).

b) Glykokoll

Zur Entgiftung der Benzoessäure benötigt der Organismus Glykokoll. Diese nicht essentielle Aminosäure, die in geringer Konzentration frei im Blut, in Geweben und Organen vorliegt, kann vom Organismus zur Verfügung gestellt werden, entweder synthetisch aus Zwischenprodukten des Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsels, oder hydrolytisch durch Freisetzung von Glykokoll aus gespeicherten Proteinen (Struwe 1953, Löwe und Wilhams 1965, Flaschenträger und Lehnartz 1967, Garfinkel und Lajtha 1963).

2. Entgiftung der Benzoesäure

Der Organismus eliminiert die Benzoesäure, die unter normalen Umständen rasch resorbiert (Schanker und Mitarb. 1958, Vogel und Mitarb. 1966) und nicht gespeichert wird (Lang 1960), indem er sie mit Glykokoll konjugiert und als Hippursäure entgiftet ausscheidet.

Flaschenträger und Lehnartz (1957) sprechen von 90 % Hippursäure-entgifteter Benzoesäure, La Dou und Mitarb. (1962) fanden nach Benzoesäureinjektion 95 % als Hippursäure im Urin wieder. Ihre Werte ermittelten sie mit Hilfe der Chromatographie. Bridges und Mitarb. (1970) wiesen in Versuchen mit C¹⁴ markierter Benzoesäure nach, daß 1 mg/kg Körpergewicht Benzoesäure vollkommen in Hippursäure verwandelt wird und zwar 97 % nach 4 Stunden, 100 % nach 12 Stunden. Leider wurden diese Versuche nur an zwei Probanden durchgeführt, so daß sie für allgemeingültige Aussagen nicht ausreichend sind.

3. Tägliche Ausscheidung von Hippursäure

Die Angaben verschiedener Autoren über die tägliche, normale Ausscheidung beim Menschen differieren; eine gewisse Einheitlichkeit herrscht lediglich in der Festsetzung der Maximalausscheidung. Sie wird mit 1 g/Tag

angegeben. Die Aussage, daß Herbivoren bedeutend mehr Hippursäure ausscheiden als Omnivoren, gilt auch für die menschliche Ernährung (Lang 1960).

4. Faktoren, welche die Hippursäuremenge im Urin beeinflussen

a) Exogene Faktoren

al Nahrungsmittel

Von den Faktoren exogener Natur, welche die normale Hippursäureausscheidung mitbestimmen, nehmen besonders die Nahrungsmittel eine entscheidende Stellung ein. Bei ihnen lassen sich zwei Gruppen unterscheiden:

Nahrungsmittel, bei denen der Vorläufer für die Hippursäurevermehrung bekannt ist;

Nahrungsmittel, deren die Hippursäureausscheidung beeinflussender Stoff unbekannt ist.

Jede Gruppe wiederum unterteilt sich nach ihrem Abbau im Stoffwechsel, in Benzoesäure oder Glycin liefernde Stoffe.

Hauptursprung für eine erhöhte Hippursäureausscheidung ist die in vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln enthaltene Chinasäure, die im menschlichen Organismus zu Benzoesäure umgewandelt wird.

a2 Pharmaka

Erst in den letzten Jahren wurden verstärkt Experimente durchgeführt, die klären sollten, in welchem Umfang die Hippursäuresynthese und -ausscheidung von der Medikation beeinflusst wird (Logemann und Mitarb. 1963, Kirschenbaum 1963, Liegler und Mitarb. 1969). Dabei gilt es, sorgfältig zwischen bewiesenen Korrelationen und vermuteten Zusammenhängen zu trennen. Aus der Tatsache, daß die einzelnen Autoren (La Dou und Mitarb. 1962, Johannsen und Mitarb. 1962, Vollgraff 1967 u.a.) bei der Durchführung des Quick-Tests eine medikamentenfreie Phase mehrere Tage vor Beginn der Probe für unbedingt erforderlich halten, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, läßt sich folgern, daß sie Einflüsse größeren Ausmaßes von dieser Seite her annehmen, die sich nicht nur auf die allgemein bekannte Wirkung der Salicylsäurepräparate beschränken, nach deren Gabe vermehrt ein Hippursäurederivat im Urin auftritt. Die Salicylsäure, eine o-Hydroxybenzoesäure und einige ihrer Derivate sind Bestandteile zahlreicher Pharmaka. Die Salicylsäure, die verhältnismäßig schnell resorbiert wird, scheidet der menschliche Organismus teils unverändert als freie Salicylsäure, teils als Gentisinsäure und Glucuronid oder mit Glykokoll gepaart als Salicylursäure (o-Hydroxyhippursäure) aus.

b) Endogene Bildung der Hippursäure

b1 Karenzversuche

Unter gewöhnlichen Gesundheits- und Ernährungsbedingungen stellt die Hippursäure einen normalen Bestandteil des menschlichen und zum größten Teil auch des tierischen Organismus dar. Während Glykokoll eine für den Aufbau des Organismus und für die Entgiftung von Stoffwechselprodukten notwendige Aminosäure ist, die der Körper selbst zu synthetisieren vermag, gelangt die Benzoesäure als Abbauprodukt des Stoffwechsels vorwiegend durch exogene Zufuhr oder in Form ihrer Vorläufer in den Organismus.

Nun konnte aber bei fastenden und hungernden menschlichen und tierischen Organismen ebenso Hippursäure im Urin nachgewiesen werden, so daß die Vermutung nahe liegt, daß die Bildung von Hippursäure auch ohne äußere Einflüsse endogen aus unbekannten Prozessen erfolgen kann (Wu und Elliott 1961, Kramer und Mitarb. 1965, Armstrong und Mitarb. 1956).

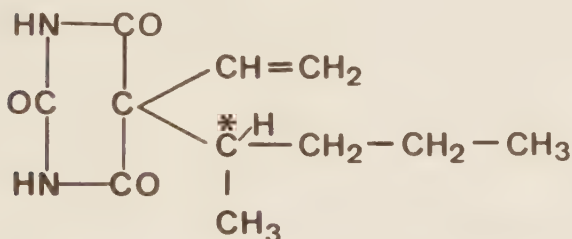
b2 Diätkost

Armstrong und Mitarb. (1955) verordneten drei Probanden zunächst über mehrere Tage eine normale Ernährung

und stellten danach eine Diätkost zusammen, welche die Versuchspersonen über weitere fünf Tage einnehmen mußten. Die Diätkost setzte sich aus weitgehend benzoesäurefreien Bestandteilen zusammen. Bei den Versuchspersonen war während der natürlichen Verpflegung eine weit höhere Hippursäureausscheidung zu beobachten als bei der Diätkost; es blieb jedoch auch bei der Versuchsernährung ein gewisser Betrag an Hippursäure im Urin nachweisbar. Diese Menge entsteht endogen, unbeeinflusst von exogenen Faktoren.

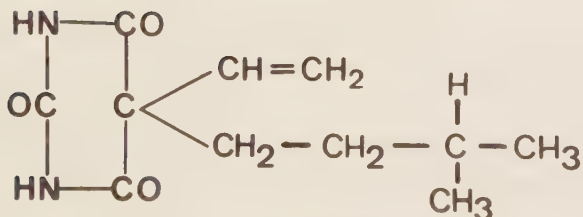
C) Frühere vorbereitende Untersuchungen

In dem Zeitraum 1969/70 führte Fröhlich (1971) am hiesigen Institut Untersuchungen über die Metaboliten von Vinylbital und 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure durch, die den Ausgangspunkt meiner Arbeit bilden.



Vinylbital

* = asymmetrisches C-Atom



5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)
barbitursäure

1. Allgemeines

Von zwei Versuchspersonen (I und II) wurde das Barbiturat Speda^R in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen eingenommen, von einer Versuchsperson (III) nur einmal. Versuchsperson I und II wurde danach je einmal das dem Speda^R verwandte Barbiturat 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure verabreicht. Nach jeder Einnahme wurde der Urin über die folgenden zehn Tage gesammelt, um in dieser Zeitspanne die ausgeschiedenen Metaboliten qualitativ und quantitativ zu erfassen.

2. Verwendetes Material

Für die Versuche mit Vinylbital wurde das Präparat Speda^R der Firma Byk-Gulden, Konstanz, verwendet. Von der gleichen Firma wurde 1,5 g 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure zur Verfügung gestellt. Dieses Barbiturat nannten wir "Isoamyl-Speda".

3. Versuchspersonen

Alle Versuche wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Personen durchgeführt.

Tabelle 1: Alter, Geschlecht und Körpergewicht der Versuchspersonen

	Alter Jahre	Geschlecht	Gewicht (kg)
I (F.F.)	24	männlich	82
II (W.S.)	26	männlich	82
III (Hj.M.)	24	männlich	72

Von allen Versuchspersonen wurde angegeben, vormals noch nie bewußt Barbiturate eingenommen zu haben. Während der Versuchsdauer wurden von keiner Person Medikamente eingenommen.

4. Zeitlicher Ablauf der Versuche

Von I und II wurden zunächst je zweimal 300 mg 5-Vinyl-5-(1-methylbutyl)barbitursäure in Form von 2 Tabletten Speda^R eingenommen. (Speda^R-Versuch 1 und 2). Bei III konnte nur ein einziger Versuchsablauf durchgeführt werden (Speda^R-Versuch 3), da anschließend wegen einer chronischen

Infektion über lange Zeit Antibiotika genommen werden mußten.

Von Versuchsperson I und II wurden sodann je einmal 300 mg 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure in Form der pulverförmigen Reinsubstanz eingenommen. Um Fermentinduktionen zu vermeiden, wurden zwischen den einzelnen Versuchen bei der ersten und zweiten Versuchsperson längere Zeitabstände eingehalten, die in Tabelle 2 aufgezeigt sind.

Tabelle 2: Zeitabstände zwischen den Versuchen bei den einzelnen Versuchspersonen

Zeitabstände d.Versuche (Monate)		
	F.F. Vers.Person I	W.S. Vers.Person II
Speda ^R -Versuch 1	 5 22 21	 1 1/3 21 21
Speda ^R -Versuch 2		
"Isoamyl-Speda"-Versuch		

5. Experimentelles Vorgehen

a) Einnahme des Barbiturates

Die Versuchspersonen nahmen abends vor dem Schlafengehen nach Entleerung der Blase je 300 mg Speda^R ein. Über die folgenden 10 Tage wurden alle Urinausscheidungen getrennt gesammelt und bis zur Aufbereitung, längstens 48 Stunden, im Kühlraum bei 3-4° C gelagert. Ebenso wurde Isoamyl-Speda verabreicht und der Urin in gleicher Weise gesammelt und gelagert.

b) Aufarbeitung der Urinausscheidungen

Von jeder Urinausscheidung wurden innerhalb der nächsten 48 Stunden 50 ml mit 20 %iger Weinsäure auf pH 2,0 - 2,5 gebracht und mit dem doppelten Volumen Äther zweimal in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Dabei entstanden in den meisten Fällen Emulsionen, die wegen ihrer langsamen Trennung durch Zentrifugieren bei 4000 U/min über 5 Minuten in die beiden Phasen getrennt wurden. Die Extrakte wurden anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad eingedampft, der Extrakt-rückstand mit 0,5 ml Äthanol aufgenommen und davon mehrfach 0,04 ml punktförmig auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) aufgetragen. Nach zwölf-

stündiger aufsteigender Entwicklung in dem Fließmittelgemisch n-Butanol-Ammoniak nach Algeri und Walker (1952) wurden die Bogen getrocknet. Die im gefilterten UV-Licht der Wellenlänge 254 nm erscheinenden Absorptionen wurden markiert. Die Zonen, die im UV-Licht Absorption zeigten und sich zum Teil nach Besprühen mit gesättigter $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ -Lösung angefärbt hatten, wurden spätestens nach 48 Stunden ausgewaschen, 20 Minuten in Boratpuffer (pH 10) eluiert und spektrophotometrisch zwischen 210 nm und 330 nm, ebenso in verdünnter NaOH bei pH 14 und verdünnter H_2SO_4 -Lösung, untersucht. (Selbstregistrierendes Spektralphotometer Modell DK 2 der Firma Beckman Instruments, München).

Die gleiche Verfahrensweise wurde mit den Urinproben nach Verabreichung von 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure angewandt.

6. Gefundene Metaboliten nach Verabreichung von:

a) Speda^R

Die Untersuchung der durch UV-Licht und durch Besprühen mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ erhaltenen Flecke des Chromatogramms mit dem R_f -Wert 0,38 - 0,46 ergaben Absorptionsmaxima bei

266 nm - 269 nm bei pH 10 und pH 14, keine Absorptionsmaxima jedoch in verdünnter H_2SO_4 -Lösung.

Auch die meisten Fraktionen, deren Rf-Wert bei 0,35 - 0,44 lag, ergaben ein Maximum bei 266 nm - 269 nm bei pH 10 und pH 14.

Auftretende Unterschiede des Rf-Wertes, dürften auf die Änderung des Laufmittelgemisches während längeren Gebrauchs zurückzuführen sein.

Geldmacher-v.Möllinckrodt und Mitarb. (1968), sowie Preuß und Mitarb. (1968), haben diese Monobarbituratfraktion als 5-(1-Methylbutyl)barbitursäure identifiziert.

Die zum Rf-Wert 0,35 zugehörige Fraktion wurde als Hippursäure identifiziert (siehe unten). Nach der papierchromatographischen Methode lassen sich mit dem verwendeten Laufmittelgemisch Hippursäure und Benzoesäure nicht immer ausreichend voneinander trennen; auch eine Unterscheidung nach den UV-Absorptionskurven ist nicht sicher möglich. Nach Ziener (1971) wissen wir aber, daß in frischen Urinproben keine freie Benzoesäure auftritt; auch nach Medikamentaufnahme (Adalin, Miltaun) ließ sich keine freie Benzoesäure feststellen (Beierlein, Piechotka, Schwarz).

b) "Isoamyl-Speda"

Die Extinktionsmaxima der Flecke mit dem Rf-Wert 0,38 - 0,46 und dem Absorptionsmaximum bei 269 nm waren nicht so deutlich wie die Extinktionsmaxima der eluierten Chromatogrammflecke nach Verabreichung von Speda^R. Das Absorptionsmaximum war praktisch nur im Boratpuffer (pH 10) ausgeprägt. Geldmacher-v.Mallinckrodt und Mitarb. (1958) haben beim Speda^R diese Fraktion als 5-(1' Methylbutyl)barbitursäure identifiziert, hier dürfte es sich um den entsprechenden Metaboliten handeln.

D) Eigene Untersuchungen

1. Ziel der Untersuchungen

Ein Ziel meiner Arbeit sollte zunächst die Isolierung der bei den Chromatogrammen auftretenden oberen, mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ anfärbbaren Fraktion mit dem Rf-Wert 0,35 - 0,46 sein, also der Monobarbituratfraktion, die sich in dem angegebenen Bereich zusammen mit Hippursäure und Benzoesäure befindet (s.S. 21). Außerdem sollte die Hippursäureausscheidung nach Einnahme des Barbiturats Speda^R über einen Zeitraum von 10 Tagen quantitativ bestimmt werden.

2. Übernommenes Material

Von Fröhlich übernahm ich die noch nicht verwerteten Urinproben der Speda^R- und "Isoamyl-Speda"-Versuche, die im Kühlraum bei 3 - 4° C lagerten, Extraktionsrückstände verarbeiteter Urinproben und UV-Absorptionskurven von Barbituratversuchen mit Speda^R; und zwar zweimal von Versuchsperson II (Speda^R-Versuch 1 und 2) und einmal von Versuchsperson III (Speda^R-Versuch 3; s.S. 17).

3. Experimentelles Vorgehen

a) Herstellung der Hippursäure-Eichkurve

Zur Herstellung der Eichkurve wurde eine wässrige Lösung von Hippursäure in einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt und in wechselnder Menge 50 ml Wasser zugesetzt. Danach wurde nach der unter 5b angegebenen Methode vorgegangen und nach chromatographischer Auftrennung und Elution die Extinktion bei 224 nm im UV-Spektrophotometer gemessen. Durch die Beziehung der Menge der zugesetzten Hippursäure zu der entsprechenden Extinktion ergab sich eine Gerade.

b) Aufarbeiten der gelagerten Urinproben

Bei den noch nicht verarbeiteten Urinproben gewann ich den Harnextrakt durch Ausäthern in der Apparatur nach Kutscher-Stedel. Dazu säuerte ich den Urin mit 20 %iger Weinsäure auf mindestens pH 3 an, versetzte ihn mit Äther und ließ die mit diesem Gemisch gefüllte Apparatur etwa 10 Stunden laufen. Weil der Urin mit weiterer Lagerung zunehmend alkalischer wurde, und somit der benötigte Weinsäureanteil unverhältnismäßig anstieg, säuerte ich später mit HCl an.

c) Chromatographische Trennung der Metaboliten

Die anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten und über dem Wasserbad eingedampften Extrakte löste ich in Methanol und trug sie bandförmig auf Chromatographiepapier auf (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b). Nach 14 Stunden Laufzeit in dem Fließmittelgemisch n-Butanol/Ammoniak nach Algeri und Walker (1952) zeigten sich auf den getrockneten Chromatogrammen über gefiltertem UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zwei schmale Absorptionsbanden, eine untere mit dem Rf-Wert von 0,05 - 0,06 und eine obere mit dem Rf-Wert von 0,35 - 0,46, von denen ich die obere kennzeichnete und her-

ausschnitt. Bei mehreren Chromatogrammen zeigte die obere Bande eine Zweiteilung, die auch durch Besprühen mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ nachzuweisen war. Anschließende Untersuchungen mit dem UV-Spektralphotometer ergaben für die beiden Absorptionen und den dazwischenliegenden Teil die für den einen Metaboliten von Vinylbital charakteristischen Absorptionsmaxima bei 266- 269 nm bei pH 10 bzw. pH 14 (s.S. 20).

d) Kontrolluntersuchungen

Da die zu untersuchenden Proben schon längere Zeit aufbewahrt worden waren und damit die Gefahr der Umsetzung der Barbituratfraktion bestand, führte ich zu Beginn und während meiner Versuche Kontrollen zum Nachweis dieser Fraktion durch. Das Ergebnis war stets positiv:

d1 Die entsprechende Fraktion der Chromatogrammmstreifen färbte sich mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ schwarz;

d2 Auf dem UV-Spektrogramm waren die für Metaboliten von Vinylbital charakteristischen Absorptionsmaxima bei 266 - 269 nm bei pH 10 bzw. pH 14 zu finden (s.S. 20).

e) Untersuchung der Fraktion mit dem Rf-Wert 0,35 - 0,46

e1 Isolierung einer kristallinen Substanz

Die zerkleinerten Chromatogramstreifen wurden in 0,2n NH_3 zweimal eine halbe Stunde eluiert und mit 20 %iger Weinsäure bis pH 3 angesäuert, mit der doppelten Menge Äther dreimal ausgeschüttelt und der Ätherextrakt über dem Wasserbad eingedampft. Es kristallisierte eine gelblichbraune Substanz mit langen, sternförmig angeordneten Nadeln aus. Eine Kontrolle der Papierschnitzel, bei der sich durch Besprühen mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ keine Anfärbbarkeit zeigte, bewies, daß die Fraktion völlig eluiert worden war.

e2 Vakuumsublimation

Eine Vakuumsublimation bei steigender Temperatur ergab erst nach Erhitzen auf über 200°C eine kristalline Fraktion, die sich nach der Temperaturskala in dem Bereich von $130 - 190^\circ \text{C}$ niederschlug. Eine Analyse der Kristalle aus dem Bereich um 130°C durch einen Infrarotspektrographen identifizierte diese als Benzoesäure; eine Mikrosublimation der wenigen unterhalb 190°C sublimierten Kristalle zeigte lange Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 190°C , was auf

Hippursäure deutete. Dies wurde durch eine Infrarotanalyse der Kristalle aus dem Bereich von 160–180° C bestätigt; insgesamt ein Ergebnis, das mit den Untersuchungen von Walz sowie Deisel übereinstimmt.

e3 Versuche zur Gewinnung von reinem Monobarbiturat

Zur Isolierung der Monobarbituratfraktion löste ich die eingedampfte Fraktion in Aqua dest. und versetzte mit NH_3 bis zu einem pH-Wert von 7. Die Untersuchung der durch dreimaliges Ausäthern und Eindampfen erhaltenen Kristalle brachte keine mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ anfärbare Substanz. Durch Zugabe von Weinsäure säuerte ich den Rückstand auf einen pH-Wert von 3 an und erhielt ebenfalls nach dreimaligem Ausäthern und Eindampfen eine Substanz, die keine charakteristische UV-Absorptionskurve ergab.

Als erfolgreich erwies sich, stärker sauer zu arbeiten und die ausgeschnittenen Chromatogramstreifen mit n/10 HCl zu besprühen und danach in Äther zu eluieren. Nach dieser Methode wurden die restlichen Chromatogramme behandelt und die gewonnene Substanz gesammelt.

Die Gewinnung reiner Substanz sollte über eine Säule in Anlehnung an ein von Dietz und Soehring entwickeltes und von Preuß und Müller für ähnliche Versuche

angewandtes Verfahren zur Auftrennung von Barbiturat-metaboliten durchgeführt werden. Dazu wurde die gesamte Substanz in Äther gelöst und im Scheidetrichter im Verhältnis 2:1 mit einer etwa 5 %igen wässrigen (Aqua bidest.) Bleiazetatlösung 1/4 Minute lang geschüttelt, und die Emulsion zentrifugiert. Der mit Natriumsulfat getrocknete Ätherauszug wurde durch ein mit Aktivkohle gefülltes Glasrohr bei einer Tropfenfolge von 1 - 2/sec mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in ein Auffanggefäß gesaugt, das in einer Saugflasche untergebracht war. Nur die erste von drei Fraktionen nach einer je 20 minütigen Laufzeit erbrachte im IR-Spektralphotometer ein Ergebnis, nämlich die Isolierung von fast reiner Benzoesäure.

4. Auswertung

Das Monobarbiturat konnte nicht isoliert werden.

Die nachgewiesene Benzoesäure nach Vakuumsublimation von Kristallen aus dem weinsauren Ätherextrakt der Chromatogrammfraktion mit dem Rf-Wert von 0,35 - 0,46 (s.S. 26) bei über 200° C läßt sich möglicherweise auf einen Zerfall anwesender Hippursäure zurückführen, jedoch kann als sicher gelten, daß die über die Chromatographie-Säule

isolierte Benzoessäure genuin in älteren Harnproben vorhanden war, denn hier wurde während des gesamten Arbeitsganges (Extraktion im Apparat nach Kutscher-Steudel, Eindampfen der Extrakte) eine Temperatur von 37° C nicht überschritten.

E) UV-spektrophotometrische Auswertung der Hippursäurefraktionen von drei Barbituratversuchen (Speda^R)

1. Ermittlung der Hippursäurekonzentration und Hippursäuremenge einzelner Harnproben

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Speda^R und der Hippursäureausscheidung erkennen zu können, galt es, Konzentration und Hippursäuremenge einzelner Urinproben bzw. die gesamte Tagesausscheidung in zeitlicher Abhängigkeit darzustellen.

Zur Errechnung der Hippursäurekonzentration jeder Urinprobe wurde die Extinktion der Hippursäure-UV-Absorptionskurven abgelesen, und zwar im Maximum bei 223 - 227 nm, das beim Durchgang des UV-Lichts im Wellenlängenbereich von 210 - 330 nm durch die in Boratpufferlösung (pH 10) eluierte Hippursäure entstanden war (s.S. 20). Die Größe der

Extinktion entspricht einer bestimmten Hippursäuremenge im Harnextrakt und damit in jeder Harnprobe. Mit Hilfe der Eichkurve (s.S. 23) konnte die Hippursäurekonzentration pro Harnprobe bestimmt werden und daraus die anderen benötigten Werte.

Da einige UV-Absorptionskurven nicht ausgewertet werden konnten, treten an einigen Stellen der graphischen Darstellungen Leerstellen bzw. gestrichelte Linien auf.

2. Darstellung der Hippursäureausscheidung unter verschiedenen Gesichtspunkten

a) Hippursäuremenge einzelner Urinproben in zeitlichem Ablauf

Einmal wurde die Hippursäuremenge in mg pro Urinprobe in zeitlichem Ablauf dargestellt (Abb. 1, 2, 3).

Abb. 1: Speda^R-Versuch 1, Versuchsperson II

Ausgeschiedene Hippursäuremenge in mg
in zeitlichem Ablauf nach Einnahme von
300 mg Speda^R

mg pro HARNPROBE

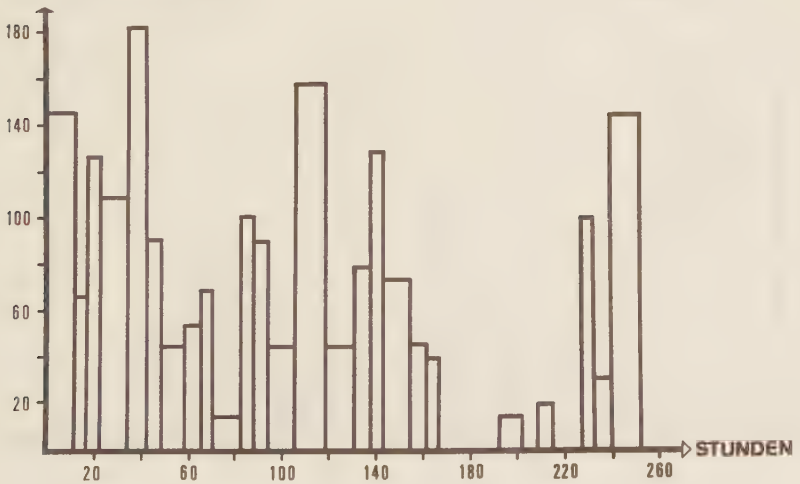


Abb. 2: Speda^R-Versuch 2, Versuchsperson II

Ausgeschiedene Hippursäuremenge in mg
in zeitlichem Ablauf nach Einnahme von
300 mg Speda^R

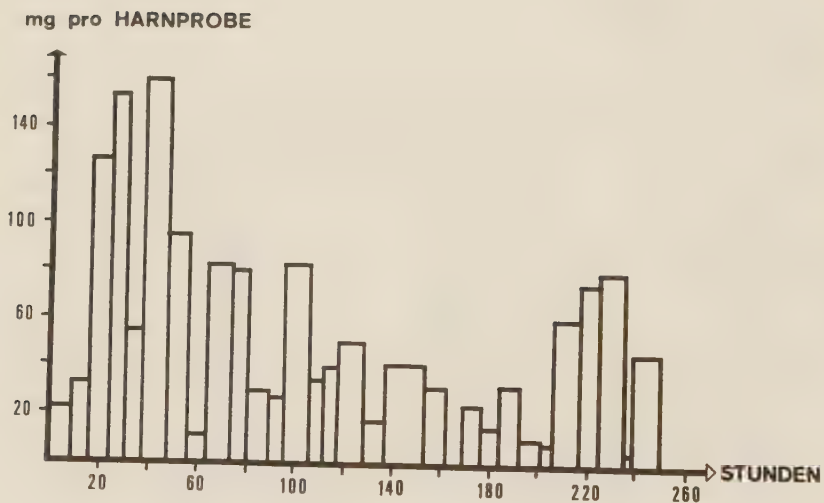
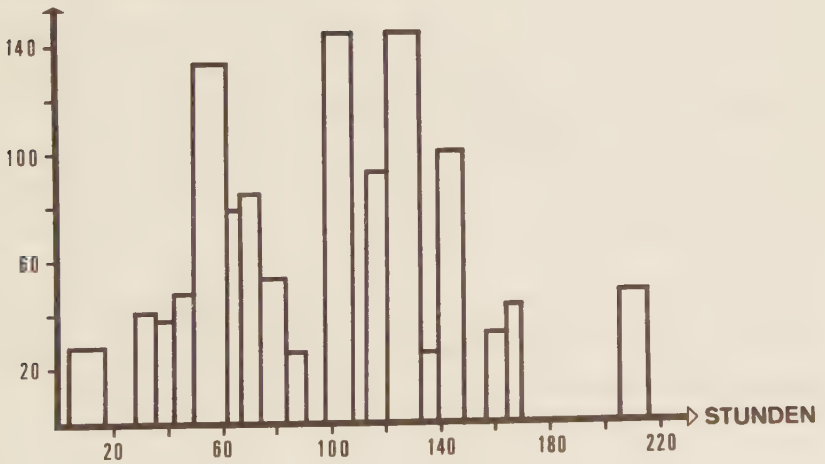


Abb. 3: Speda^R-Versuch 3, Versuchsperson III

Ausgeschiedene Hippursäuremenge in mg
in zeitlichem Ablauf nach Einnahme von
300 mg Speda^R

mg pro HARNPROBE



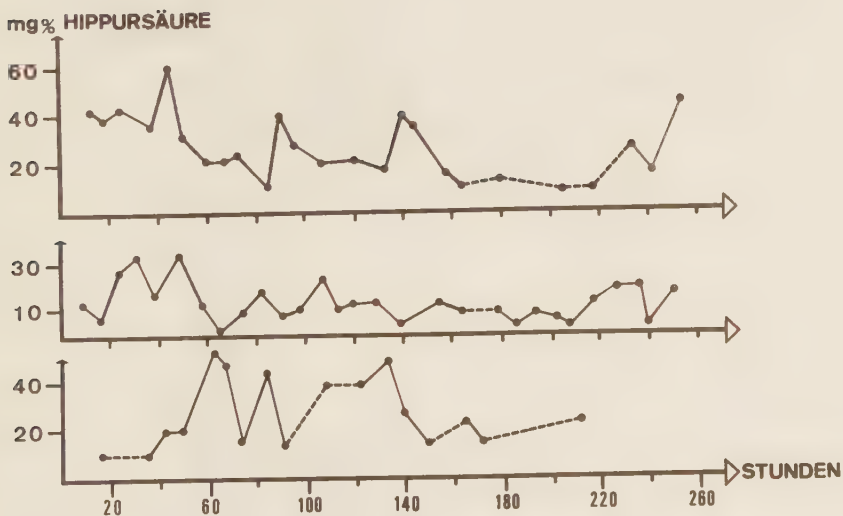
Es zeigen sich Werte mit großer Streuung. Zur statistischen Analyse aller Hippursäuremengen eines Versuchs wurde die dazugehörige Mittelwertstandardabweichung (5) errechnet. Nun zeigte sich, daß alle Werte innerhalb der Grenze der dreifachen Mittelwertstandardabweichung (36 Grenze) liegen, d.h., daß sich die teilweise hohen Werte von den übrigen Meßwerten statistisch gesehen nicht signifikant unterscheiden.

Bei derselben Versuchsperson treten nach wiederholter Einnahme derselben Menge desselben Medikaments (300 mg Speda^R) unterschiedliche Werte auf; bei Speda^R-Versuch 1, Versuchsperson II (Abb. 1), liegen die Werte durchschnittlich höher als bei Speda^R-Versuch 2, Versuchsperson II (Abb 2), wo eine stark abfallende Tendenz zu beobachten ist.

Der prozentuale Hippursäuregehalt einzelner Urinproben zeigt in seinem zeitlichen Verlauf ebenfalls stark wechselnde Werte (Abb. 4).

Abb. 4: Speda^R-Versuche 1, 2 und 3

Hippursäurekonzentration in mg% einzel-
ner Harnproben in zeitlichem Ablauf



b) Tagesausscheidung

Die Tagesausscheidung von Hippursäure zeigt zwar zwei Maximalwerte bei Speda^R-Versuch 1, Versuchsperson II (Abb. 5) am 2. und 6. bzw. bei Speda^R-Versuch 2, Versuchsperson II (Abb. 6) am 2. und 10. Tag nach Medikamentaufnahme. Diese Maximalwerte sind aber nicht signifikant (3σ Grenze) höher als die anderen für die Tagesausscheidung festgehaltenen Werte. Diese Aussage gilt also auch für die Konzentration der täglich ausgeschiedenen Hippursäure.

Abb. 5: Speda^R-Versuch 1, Versuchsperson II

Tägliche Hippursäureausscheidung in mg
bzw. deren Konzentration über 7 Tage

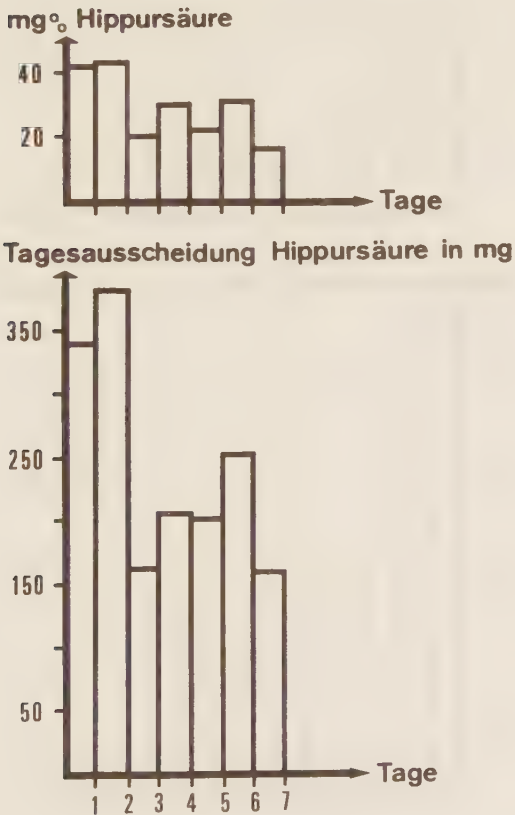
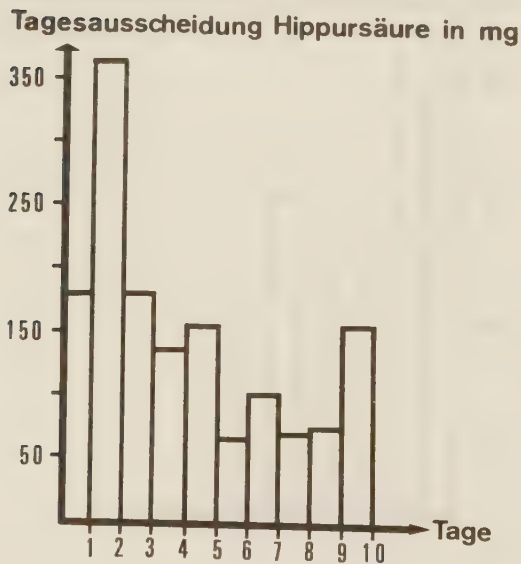


Abb. 6: Speda^R-Versuch 2, Versuchsperson II

Tägliche Hippursäureausscheidung in mg
bzw. deren Konzentration über 10 Tage



3. Vermutliche Ursache der stark schwankenden Werte

Die starken Schwankungen, die in allen graphischen Darstellungen zum Ausdruck kommen, sind wohl dadurch bedingt, daß die Versuche ohne Diätvorschriften durchgeführt wurden, so daß dem Organismus exogen unterschiedliche Mengen Benzoessäure zugeführt wurden. Die vom Organismus zu Hippursäure entgiftete Benzoessäure trat dann zusätzlich zur endogen entstandenen Hippursäure im Urin auf.

F) Zusammenfassung

Der Weg zur Abtrennung von Monobarbiturat als Metabolit von Speda bzw. "Isoamyl-Speda" nach Preuß und Müller (1968) erwies sich für die Versuche von Fröhlich als nicht gangbar, da bei der angewandten chromatographischen Auftrennung keine ausreichende Abgrenzung zu der im Verhältnis zum Monobarbiturat zu großen Menge an Benzoesäure und Hippursäure eintrat.

Es konnte keine signifikante (36 Grenze) Erhöhung der Hippursäureausscheidung direkt nach Einnahme von Speda^R im Vergleich zu den nachfolgenden 7-10 Tagen festgestellt werden; es ergaben sich nur stark wechselnde Mengen bzw. Konzentrationen, die vermutlich auf eine Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme zurückzuführen sind.

Der Nachweis von Benzoesäure in älteren Harnproben kann als Hinweis auf eine Umsetzung während längerer Urinlagerung auch bei 3-4° C angesehen werden.

G) Literaturverzeichnis

1. BEIERLEIN, A.
Dissertation Erlangen in Vorbereitung
2. DEISEL, K.
Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von
Bromdiaethylacetylcarbamid im Harn.
Dissertation Erlangen (1955)
3. DIETZ, W., K. SOEHRING
Experimentelle Beiträge zum Nachweis von Thio-
barbitursäuren aus dem Harn mit Hilfe der
Papierchromatographie
Arch. Pharmaz. 290/62, 80 (1957)
4. FRÖHLICH, F.
Vergleichende Untersuchungen des Stoffwechsels
von 5-Vinyl-5-(1'methylbutyl)barbitursäure
und 5-Vinyl-5-(3'methylbutyl)barbitursäure
beim Menschen.
Dissertation Erlangen (1971)
5. Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., G. MACHBERT,
GELDMACHER, J.
Zum Stoffwechsel der 5-Vinyl-5(1'methylbutyl)-
barbitursäure beim Menschen.
Arzneimittel-Forsch. 18, 350 (1968)
6. KADELBURG, I.
Die Hippursäureausscheidung im Urin.
Dissertation Erlangen (1971)

7. PIECHOTKA, R.
Dissertation Erlangen in Vorbereitung
8. PREUSS, Fr.R., D. MÜLLER
Untersuchungen zur Biotransformation von
5-(1'Methyl-n-butyl)-5-vinylbarbitursäure
(Vinylbital).
Arzneimittel-Forsch. 18, 412 (1968)
9. SCHMIDT, G.
Vorkommen und Ausscheidung von ~~Δ~~-Äthyl-~~Δ~~-
Oxybuttersäure nach Adalinaufnahme.
Arch.exper. Path. u. Pharmacol. 229, 67 (1956)
10. SCHWARZ, W.
Dissertation Erlangen in Vorbereitung
11. WALZ, K.E.
Beitrag zur Frage der Ausscheidung und des
Nachweises von Adalin im Harn.
Dissertation Erlangen (1954)
12. ZIENER, H.
Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von
Hippursäure und Benzoesäure im menschlichen Harn.
Dissertation Erlangen (1971)

Herrn Prof.Dr.Dr.E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die zahlreichen Anregungen und für die grosse Hilfsbereitschaft, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ganz wesentlich erleichterten.

Für die Anfertigung der Fotos möchte ich mich bei Herrn Hauptpräparator O.Opitz recht herzlich bedanken.

Lebenslauf

Ich, Ulf Glawatz, wurde als einziges Kind des Tierarztes Dr. Eberhard Glawatz und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Miemann, am 28.4.1943 in Buxtehude geboren. Nach dem Tod meines Vaters am 20.6.1944 zog meine Mutter mit mir zu ihren Großeltern nach Heber im Kreis Soltau, wo ich Ostern 1949 eingeschult wurde. Nach vier Jahren Grundschule bestand ich die Aufnahmeprüfung für die Mittelschule in Schneverdingen, die ich zwei Jahre besuchte. Ostern 1955 wechselte ich auf das neusprachlich-naturwissenschaftliche Gymnasium Soltau über, wo ich zur Oberstufe den naturwissenschaftlichen Zweig wählte und im Februar 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einjährigem Grundwehrdienst begann ich zum Sommersemester 1966 in Erlangen mit dem Studium der Zahnmedizin. Hier legte ich im Herbst 1967 das Vorphysikum ab. Die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im November 1968 und schloß mein Studium mit dem Staatsexamen im Mai 1971 ab.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990